

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-224397
(43)Date of publication of application : 21.08.2001

(51)Int.Cl. C12Q 1/60
C12Q 1/26
C12Q 1/44
G01N 33/92

(21)Application number : 2000-039992 (71)Applicant : DENKA SEIKEN CO LTD
(22)Date of filing : 17.02.2000 (72)Inventor : MATSUI HIROSHI
MIZUNO KAZUE
ARAI KAZUHIKO
NISHIMURA KATSUHIKO

(54) METHOD FOR QUANTITATING CHOLESTEROL IN LOW DENSITY LIPOPROTEIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for avoiding influences of high TG(triglyceride) value in a sample in the measuring method eliminating cholesterol in lipoprotein except LDL(low density lipoprotein) in the first step and quantitating LDL cholesterol in the second step.

SOLUTION: The first step eliminating the cholesterol in lipoprotein except low density lipoprotein in a tested sample is carried out in the presence of albumin in the method for quantitating cholesterol in low density lipoprotein in a tested sample comprising the first step and the second step quantitating the residual cholesterol in the tested sample.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-224397

(P2001-224397A)

(43)公開日 平成13年8月21日(2001.8.21)

(51) Int.Cl.⁷
C 12 Q 1/60
1/26
1/44
G 01 N 33/92

識別記号

F I
C 12 Q 1/60
1/26
1/44
G 01 N 33/92

テ-マコ-ト(参考)
2 G 0 4 5
4 B 0 6 3
B

審査請求 未請求 請求項の数 8 O.L. (全 6 頁)

(21)出願番号 特願2000-39992(P2000-39992)

(22)出願日 平成12年2月17日(2000.2.17)

(71)出願人 591125371
デンカ生研株式会社
東京都中央区日本橋茅場町三丁目4番2号
(72)発明者 松井 寛史
新潟県五泉市大字木越字鏡田1359番1 デ
ンカ生研株式会社鏡田工場内
(72)発明者 水野 和重
新潟県五泉市大字木越字鏡田1359番1 デ
ンカ生研株式会社鏡田工場内
(74)代理人 100088546
弁理士 谷川 英次郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法

(57)【要約】

【課題】 第1工程でLDL以外のリポ蛋白中コレステロールを消去し、第2工程でLDLコレステロールを定量する測定方法において試料中の高TGの影響を回避する方法を提供すること。

【解決手段】 被検試料中の低密度リポ蛋白以外のリポ蛋白中のコレステロールを消去する第1工程と、次いで、被検試料中の残存コレステロールを定量する第2工程とから成る、被検試料中の低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法において、前記第1工程をアルブミンの存在下で行う。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検試料中の低密度リポ蛋白以外のリポ蛋白中のコレステロールを消去する第1工程と、次いで、被検試料中の残存コレステロールを定量する第2工程とから成る、被検試料中の低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法において、前記第1工程をアルブミンの存在下で行うことを特徴とする方法。

【請求項2】 前記第1工程の反応溶液中の前記アルブミンの濃度は0.1~5.0 g/dLである請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記第1工程の反応は、pH 5~9、温度30~40°Cで行う請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 前記第1工程は、低密度リポ蛋白以外のリポ蛋白に作用する界面活性剤の存在下において、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを作用させ、生じた過酸化水素を消去することから成る、請求項1記載の方法。

【請求項5】 前記第2工程は、前記第1工程の産物に、少なくとも低密度リポ蛋白に作用する界面活性剤を加え、前記コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼの作用により生じた過酸化水素を定量することから成る、請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記少なくとも低密度リポ蛋白と作用する界面活性剤は、全てのリポ蛋白に作用するものである請求項5記載の方法。

【請求項7】 前記第1工程で用いられる、低密度リポ蛋白以外のリポ蛋白に作用する界面活性剤は、HLB値が13以上15以下であるポリアルキレンオキサイド誘導体である請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 前記第2工程で用いられる、全てのリポ蛋白に作用する界面活性剤は、HLB値が11以上13未満であるポリアルキレンオキサイド誘導体である請求項5記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、被検試料中の低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 低密度リポ蛋白中のコレステロール（以下、「LDLコレステロール」という）は血液中におけるコレステロール運搬の主役であり、特に粥状動脈硬化において血管壁に沈着したコレステロールは主にLDLに由来している。LDLの増加は動脈硬化性疾患の主要な危険因子の一つであり、分別定量することは臨床上有用である。

【0003】 従来からのLDLコレステロールの定量方法は、分画とコレステロール定量の2つの操作から求めめる方法と総コレステロール、HDLコレステロール、トリグリセリド値より求めるFriedewald式によ

る演算方法がある。

【0004】 分画操作としては超遠心法、沈殿法、免疫法等があるが、試料を遠心処理またはフィルター処理による操作が必要となり、臨床検査の場において簡便性や経済性において普及しにくい状況にあった。また、Friedewald式による演算方法もその使用に制限があり、かつ個体差を加味していないため正確性に問題があった。

【0005】 しかしながら、近年になり分画操作を要しないLDLコレステロール定量方法（公開番号 特開平11-318496）が報告され、現在、臨床検査用試薬として検査の場で適用されつつある。この方法は、第1工程で試料中のLDL以外のリポ蛋白中コレステロールを選択的に消去（消去とはエスチル型コレステロールと遊離型コレステロールを分解し、その分解物が第2工程で検出されないようにすることを意味する）し、第2工程でLDLコレステロールを定量するものである。

【0006】 しかし、特殊な臨床検体においては、トリグリセリド（TG）値が異常高値を示すものについて負の測定誤差を生じるという問題点があった。それ故に、この問題点を回避することが測定法としての有用性を高めることとなり、その方法が望まれている状況にあつた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、第1工程でLDL以外のリポ蛋白中コレステロールを消去し、第2工程でLDLコレステロールを定量する測定方法において試料中の高TGの影響を回避する方法を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本願発明者らは負の測定誤差の原因について調査した結果、第1工程の消去時において試料中に高濃度のTGが存在すると、本来消去されなければならないLDL中コレステロールが消去され始めることを突き止めた。さらに高濃度TGの存在はTGを多く含むカイロミクロン（CM）、超低密度リポ蛋白（VLDL）等のリポ蛋白が多く存在することを意味し、これらが、LDLコレステロールの消去を誘発していることがわかった（LDLを含むこれらリポ蛋白は、コレステロールやTG、リン脂質、蛋白の集合体として粒子系を形成しており、それぞれのリポ蛋白によって蛋白の種類やコレステロール、TG量の違いがある）。

【0009】 具体的には、CMとVLDLが試料中に存在すると第1工程においてCM、VLDL中のコレステロールは分解し消去されるが、他の蛋白、リン脂質等の残骸物は残る。そのため試料中のCM、VLDL濃度が高くなるにつれて、これら残骸物濃度も高くなり、一部の残骸物のLDLへの吸着も起こり始める。そして、吸着したLDLが、LDL以外のリポ蛋白と認識され消去が起こり始めることが明らかとなってきた。

【0010】そこで、残骸物のLDLへの吸着を抑える方法について検討した結果、第1工程中にアルブミンを添加することにより、残骸物がアルブミンに吸着され、LDLへの影響を回避する事ができた。

【0011】すなわち、本発明は、被検試料中の低密度リポ蛋白以外のリポ蛋白中のコレステロールを消去する第1工程と、次いで、被検試料中の残存コレステロールを定量する第2工程とから成る、被検試料中の低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法において、前記第1工程をアルブミンの存在下で行うことを特徴とする方法を提供する。

【0012】

【発明の実施の形態】リポ蛋白中に含まれるコレステロールとしては、エステル型コレステロール（コレステロールエステル）及び遊離型コレステロールがある。本明細書において、単に「コレステロール」という場合には、これらの両者を包含する。

【0013】本発明の方法に供される被検試料としては、HDL、LDL、VLDL及びCM等のリポ蛋白を含むかもしれない試料であればいずれのものでもよく、例えば、血液、血清、血漿等の体液やその希釈物を挙げることができると共にこれに限定されるものではない。

【0014】本発明の方法は、第1工程及び第2工程から成り、第1工程では被検試料中のHDL、VLDL及びCM中のコレステロールを消去し、続く第2工程では、被検試料中の残存コレステロールを定量する。第1工程でHDL、VLDL及びCM中のコレステロールが消去されているので、第2工程で定量されるコレステロールは、主として被検試料中のLDL中のコレステロールである。

【0015】第1工程における「消去」とは、コレステロールを分解し、かつ、その分解産物が次の第2工程で検出されないようにすることを意味する。LDL以外のリポ蛋白、すなわち、HDL、VLDL、CM等に含まれるコレステロールを選択的に消去する方法としては以下の方針を挙げることができる。

【0016】すなわち、低密度リポ蛋白以外のリポ蛋白に作用する界面活性剤の存在下において、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを作らせ、生じた過酸化水素を消去する。

【0017】過酸化水素を消去する方法としては、カタラーゼを作用させて水と酸素に分解する方法、及びペルオキシダーゼを用いてフェノール系又はアニリン系水素供与体化合物と過酸化水素を反応させて無色キノンに転化する方法を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0018】第1工程の反応液中のコレステロールエステラーゼ濃度は0.2~1.0U/mL程度が好ましく、由来としてはショードモナス属細菌から生成されるものが効果的である。また、コレステロールオキシダ-

ゼの濃度は0.1~0.7U/mL程度が好ましく、細菌や酵母由來のものを用いることが好ましい。さらに、カタラーゼの濃度は40~100U/mL程度が好ましい。また、過酸化水素を無色キノンへ転化する場合のペルオキシダーゼの濃度は0.4~1.0U/mLが好ましく、フェノール系又はアニリン系水素供与体化合物の濃度としては0.4~0.8mmol/Lが好ましい。

【0019】第1工程で用いられる、LDL以外のリポ蛋白に作用する界面活性剤の好ましい例として、HLB値が13以上15以下、好ましくは13以上14以下であるポリアルキレンオキサイド誘導体を挙げができる。誘導体の例としては高級アルコール縮合物、高級脂肪酸縮合物、高級脂肪酸アミド縮合物、高級アルキルアミン縮合物、高級アルキルメルカプタン縮合物、アルキルフェノール縮合物を挙げができる。なお、界面活性剤のHLB算出方法は周知であり、例えば「新界面活性剤」、堀内博著、昭和61年、三共出版に記載されている。

【0020】HLB値が13以上15以下のポリアルキレンオキサイド誘導体の好ましい具体例としては、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等でHLB値が13以上15以下の化合物を挙げができるがこれらに限定されるものではない。

【0021】第1工程で用いられる上記界面活性剤の濃度は、0.1~10g/l程度が好ましく、さらに好ましくは0.5~5.0g/l程度である。

【0022】第1工程は、pH5~9の緩衝液中で行うことが好ましく、緩衝液としてはトリス、トリエタノールアミン、グットの緩衝液等のアミンを含む緩衝液が好ましい。特にグット緩衝液であるBis-Tris、PIPES、MOPS、BES、HEPES及びPOPSOが好ましく、緩衝液の濃度は10~500mM程度が好ましい。

【0023】第1工程で、LDLとの反応を抑え、他のリポ蛋白の消去をさらに高めるために、反応液中に2価の金属イオンを含ませてもよい。2価の金属イオンとしては銅イオン、鉄イオン及びマグネシウムイオンを使用することができるが、特にマグネシウムイオンが好ましい。2価の金属イオンの濃度は5~200mM程度が好ましい。

【0024】なお、第1工程の反応液中には、任意的に、リポ蛋白分解酵素を加えることもできる。この酵素を加えることにより、特にVLDL中のコレステロールが反応しやすくなるので好ましい。この酵素の反応液中濃度は、5.0~10.0U/mL程度が好ましい。

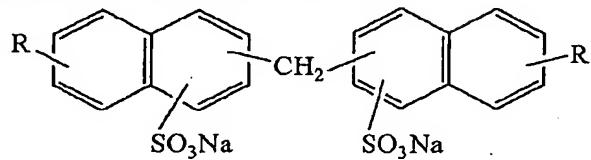
【0025】第1工程の反応温度は30～40°C程度が適当であり、37°Cが最も好ましい。また、反応時間は2～10分間程度でよい。

【0026】本発明の方法では、第1工程をアルブミンの存在下で行う。アルブミンは、アルブミンであれば何ら限定されるものではなく、血清アルブミン等の市販のアルブミンを好適に用いることができる。アルブミンの起源は何ら限定されるものではなく、ヒト、ウシ、ブタ、ウマ等いずれの動物であってもよく、特に、広く用いられているウシ血清アルブミンを好適に用いることができる。第1工程の反応溶液中の前記アルブミンの濃度は0.1～5.0 g/dLが好ましく、0.3～3.0 g/dLがさらに好ましい。

【0027】続く第2工程では、被検試料中の残存コレステロールを定量する。これは、例えば、少なくともLDLに作用する界面活性剤を加え、第1工程で加えたコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼの作用により生じた過酸化水素を定量することにより行なうことができる。ここで、少なくともLDLに作用する界面活性剤は、LDLのみに選択的に作用する界面活性剤でもよいし、全てのリポ蛋白に作用する界面活性剤であってもよい。

【0028】全てのリポ蛋白に作用する界面活性剤の好ましい例として、HLB値が11以上13未満、好ましくは12以上13未満であるポリアルキレンオキサイド誘導体を挙げることができる。誘導体の例としては高級アルコール縮合物、高級脂肪酸縮合物、高級脂肪酸アミド縮合物、高級アルキルアミン縮合物、高級アルキルメルカプタン縮合物、アルキルフェノール縮合物を挙げができる。

【0029】HLB値が11以上13未満のポリアルキレンオキサイド誘導体の好ましい具体例として、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、ポリオキ



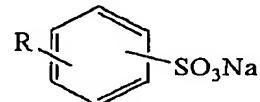
(I)

シエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等でHLB値が11以上13未満の化合物を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

【0030】また、LDLのみに選択的に作用する界面活性剤として、陰イオン界面活性剤を挙げることができる。ここで用いられる陰イオン界面活性剤としては、特に限定されないが、芳香環に炭素数4～18の直鎖状又は分枝状アルキル基が結合したものを有するものが好ましい。ここで、芳香環は、ベンゼン、ナフタレン、ジフェニール等のように炭素と水素のみから成るものが好ましい。さらに、上記芳香環にスルホン酸塩のような親水基が結合したものが好ましい。このような好ましい陰イオン界面活性剤の例を下記式(I)ないし(V)に示す。

【0031】

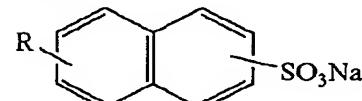
【化1】



(II)

【0032】

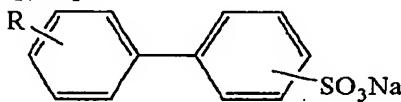
【化2】



(III)

【0033】

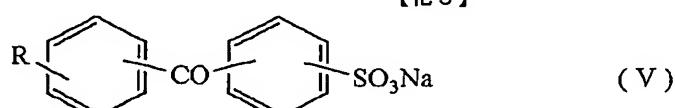
【化3】



(IV)

【0034】

【化4】



(V)

【0035】

【化5】

ができる。第2工程で用いられる界面活性剤の濃度は、0.1～100 g/l程度が好ましく、さらに好ましくは1～50 g/l程度である。

【0037】第2工程のその他の好ましい反応条件は、

【0036】但し、式(I)～(V)において、Rは炭素数4～18の直鎖状又は分枝状アルキル基を示す。また、第2工程で用いられる好ましい陰イオン界面活性剤として、高級アルコール硫酸ナトリウム等を挙げること

第1工程における好ましい反応条件と同様である。

【0038】以下、本発明の実施例に基づき具体的に説明する。もっとも本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0039】(試薬) 次の組成からなるLDLコレステロール定量試薬を調製した。さらに第1試薬にウシ血清由来のアルブミンを1.0g/dL添加した試薬も調製し、2種類の試薬で効果の確認を行った(第2試薬は共通に使用)。

【0040】

第1試薬

PIPES緩衝液 pH7.0	50 mmol/L
HDAOS	0.7 mmol/L
コレステロールエステラーゼ	0.8 U/mL
コレステロールオキシダーゼ	0.5 U/mL
カタラーゼ	80 U/mL
塩化マグネシウム	10 mmol/L
界面活性剤 エマルゲンB 66(花王社製)	0.2 %

【0041】第2試薬

PIPES緩衝液 pH7.0	50 mmol/L
4-アミノアンチピリン	4.0 mmol/L
ペルオキシダーゼ	2.4 単位/mL
アジ化ナトリウム	0.1 %
TritonX100	3.0 %

【0042】(試料) CM試料として6種類調製、それぞれ6種類の試料は全てLDLコレステロール濃度を同じとし、CM濃度だけを変えたものとした(CMの濃度差はTG値として示した)。VLDL試料もCM試料と

同様に6種類調製した。

【0043】(測定方法) 試料各4μLに、あらかじめ37°Cに加温した第1試薬300μLを混和し、37°Cで5分間反応させた後に、第2試薬100μLを加え5分間反応させ600nmにおける吸光度を測定した。測定された吸光度から事前に測定していた既知濃度試料の吸光度と比較を行い、LDLコレステロール濃度を算出した。

【0044】

【表1】CMの影響

	アルブミン未添加	アルブミン添加
試料-1(TG値 14 mg/dL)	70.7	70.4
-2(TG値 117 mg/dL)	65.3	69.4
-3(TG値 234 mg/dL)	55.9	69.7
-4(TG値 337 mg/dL)	55.3	69.4
-5(TG値 448 mg/dL)	51.1	69.5
-6(TG値 560 mg/dL)	40.8	69.1

(単位:mg/dL)

【0045】表1に示されるように、アルブミンを添加した試薬はCMの濃度が上昇しても測定値の低下とはな

らず、影響を回避していることがわかる。

【0046】

【表2】VLDLの影響

	アルブミン未 添加	アルブミン添加
試料-1(TG 値 14mg/dL)	69.3	70.1
-2(TG 値 154 mg/dL)	63.6	69.6
-3(TG 値 265 mg/dL)	59.1	70.6
-4(TG 値 435 mg/dL)	49.9	69.4
-5(TG 値 569 mg/dL)	40.8	70.4
-6(TG 値 701 mg/dL)	28.3	69.3

(単位:mg/dL)

【0047】表2のVLDLについてもCMと同様にアルブミンの効果が十分に確認できる。

【0048】

【発明の効果】本発明の方法によれば、アルブミンを添加することにより、他のリポ蛋白の影響を回避でき、従来方法に比べより高精度にLDL中のコレステロールを定量することができるという効果が奏される。

フロントページの続き

(72)発明者 新井 一彦
新潟県五泉市大字木越字鏡田1359番1 デ
ンカ生研株式会社鏡田工場内

(72)発明者 西村 雄彦
東京都中央区日本橋茅場町三丁目4番2号
デンカ生研株式会社内

Fターム(参考) 2G045 AA13 BA01 BB29 CA25 CA26
DA64 DA69 DB21 FB01
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ76 QQ89
QR03 QR12 QR41 QR48 QR51
QS20